

Détermination de la nature des hémoglobines chez 982 bovins africains et malgaches (taurins et zébus) par électrophorèse sur acétate de cellulose

par J. P. PETIT avec la Collaboration technique de P. BILLARD

Laboratoire de BIOCHIMIE I. E. M. V. T.

RÉSUMÉ

La méthode décrite permet d'utiliser des échantillons de sang total prélevés facilement et se conservant bien, très loin du lieu où ils sont recueillis, pour déterminer la nature des hémoglobines bovines. Après description du protocole d'électrophorèse sur acétate de cellulose, les résultats obtenus chez 982 bovins sont discutés avec leur interprétation statistique pour les 7 races bovines africaines et malgaches présentées. La fréquence des gènes A et B de l'hémoglobine a été calculée pour chaque race, l'indication de ses limites de confiance permettant une généralisation des résultats.

INTRODUCTION

Le laboratoire ayant entrepris l'étude biochimique des raisons de la trypanotolérance par comparaison des caractéristiques sanguines de taurins (N'Dama) et de zébus (Gobra) a été amené à déterminer si des différences existaient dans la nature des hémoglobines. On a choisi l'électrophorèse de zone sur acétate de cellulose qui permet de façon simple d'excellentes séparations de protéines pourvu qu'on se tienne à des données rigoureusement définies. L'utilisation d'une cuve peu onéreuse facilite grandement la pratique des migrations et permet notamment une détermination élégante des groupes d'hémoglobine rencontrés chez un animal.

Le support de la migration, en acétate de cellulose, était relativement peu utilisé en raison de son prix. Son coût vient récemment de baisser de moitié permettant ainsi son emploi beaucoup plus large dans les laboratoires qu'ils soient de recherche ou d'analyse courante.

Le laboratoire de biochimie de l'I. E. M. V. T. propose une méthode simple dans sa mise en œuvre depuis la récolte de l'échantillon jusqu'à la détermination des hémoglobines caractéristiques d'un bovin, méthode applicable quel que soit l'éloignement entre le lieu où se trouve l'animal et le laboratoire d'analyse. Elle a été mise au point pour déterminer rapidement le nombre et la nature des hémoglobines contenues dans les hématies de certaines races de bovins africains. Cette première étape est donc essentiellement qualitative et elle a pour point de départ des échantillons de sang total recueillis sur papier filtre ; l'acétate de cellulose utilisée selon les modalités décrites ici, permettant de déterminer la nature des hémoglobines malgré la présence des protéines plasmatiques.

I. — PRÉLÈVEMENTS

Les électrophorèses ont été effectuées en France tandis que les prélèvements étaient réalisés en

brousse par les soins d'équipes en liaison avec le laboratoire et selon une technique analogue pour toutes les régions. Le sang était récolté à l'oreille sur papier filtre Whatman 3 MM découpé préalablement au laboratoire, l'identification de l'animal se faisant directement sur ce même papier au moment du prélèvement. Il est indispensable de ne pas rassembler les papiers filtre dans leur boîte de plastique avant qu'ils ne soient bien secs. La conservation des boîtes, hermétiquement closes, sans réfrigérateur, laisse un délai d'un mois avant que les échantillons ne soient devenus inutilisables. En les mettant au réfrigérateur chaque fois qu'il est possible on peut considérablement allonger ce délai, et le porter à deux mois, pourvu que dès l'arrivée au laboratoire on conserve les boîtes, toujours closes, à -30°C .

Des études sont poursuivies pour déterminer la durée exacte d'utilisation possible.

II. — TECHNIQUE

Elle a d'abord été mise au point pour des électrophorèses de méthémoglobine alcaline purifiée de telle sorte que les impuretés protéiques soient inférieures à 2 p. 1.000. Puis on a comparé les résultats obtenus avec des échantillons provenant de sang total recueilli sur papier filtre.

a) Influence du lieu de dépôt.

Les migrations de méthémoglobines purifiées sont excellentes quel que soit le lieu de dépôt des échantillons (fig. 1) et on peut considérer qu'on se trouve dans des conditions encore meilleures que lors de l'utilisation d'hémolysats frais car alors le taux de méthémoglobine est variable dans l'échantillon et pourrait en imposer pour un nouveau type d'hémoglobine. A cause de l'interférence des protéines plasmatiques, la différenciation des deux hémoglobines A et B est meilleure quand le dépôt est fait au 1/3 de la bande vers la cathode lors de l'utilisation d'échantillons non purifiés, recueillis sur papier filtre (fig. 2).

b) Solution tampon.

C'est du véronal à pH 8,70 et de force ionique 0,09.

Véronal acide	2,76 g
Véronal sodique	15,40 g
Eau déminéralisée	1 l.

Pour obtenir exactement ce résultat il est important de n'effectuer les pesées qu'à poids constant. Cette solution est à utiliser fraîche, mais on peut la conserver 5 jours à $+4^{\circ}\text{C}$.

c) Manipulations.

1^o Préparation des bandes d'acétate.

1. Humidification.

Prendre chaque extrémité de la bande (20×150) avec des pinces en la maintenant légèrement courbe et poser la partie basse sur la solution tampon contenue dans une cuve peu profonde. Laisser retomber doucement les extrémités afin de ne pas emprisonner de bulles d'air. Après son humidification complète (10 mn), l'immerger totalement dans la solution tampon. Refirer l'excès de tampon en plaçant la bande entre deux feuilles de buvard (aucun excès de tampon ne doit rester à la surface).

2. Dépôt des bandes dans la cuve.

Dans chaque compartiment de la cuve (*) on met 500 ml de tampon. On dépose à cheval sur une des baguettes de verre qui sert à la tension de l'acétate, un morceau de papier filtre Whatman n° 1 qui est utilisé comme pont électrique en trempant largement dans le tampon et par son contact avec la bande d'acétate. On économise ainsi sur la longueur de la bande d'acétate, qu'on tend en la serrant entre deux baguettes de verre maintenues par un crochet attaché à l'extrémité d'un élastique fixé à la cuve. Dimensions du papier Whatman : 195×35 mm. On immerge le papier filtre sur 2,3 mm dans le tampon.

2^o Dépôt de l'échantillon.

A l'aide d'une micropipette (**), d'un microlitre, on dépose cette quantité d'une solution d'hémoglobine à 2 g p. 100 au 1/3 de la longueur de la bande du côté de la cathode. L'échantillon doit être régulièrement réparti sur une largeur d'environ 8 mm pour une largeur de la bande

(*) Apelab à Bagneux.

(**) Pederson.

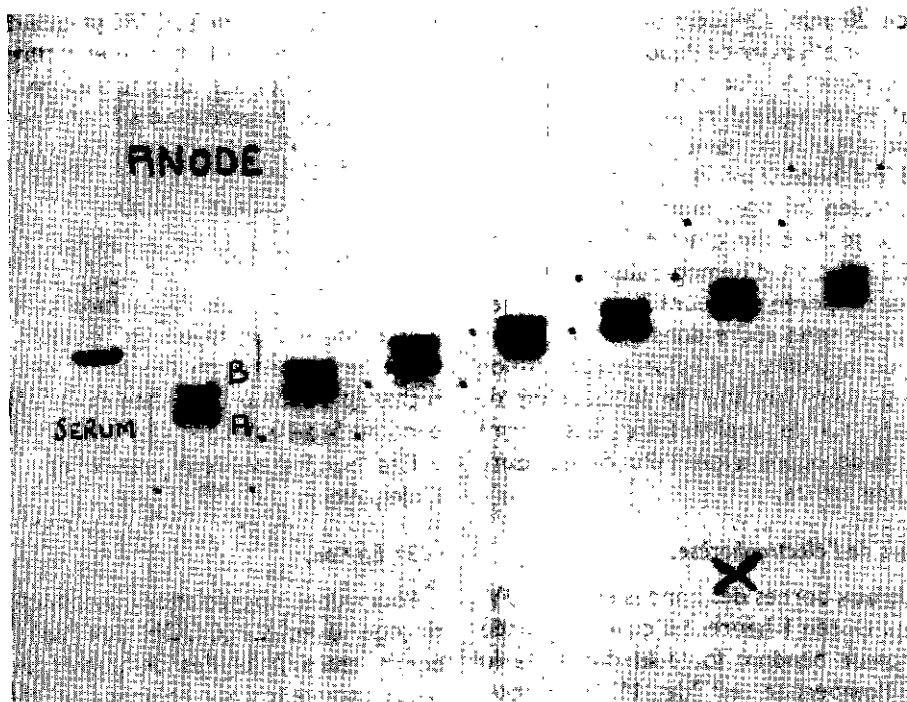


Fig. 1. — Influence de la position du dépôt de l'échantillon de Méthémoglobine purifiée sur la migration. On voit nettement que la séparation des hémoglobines A et B d'un même animal est la même quel que soit le lieu du dépôt dont on distingue la trace sur chaque bande (au même niveau que les deux points repère).

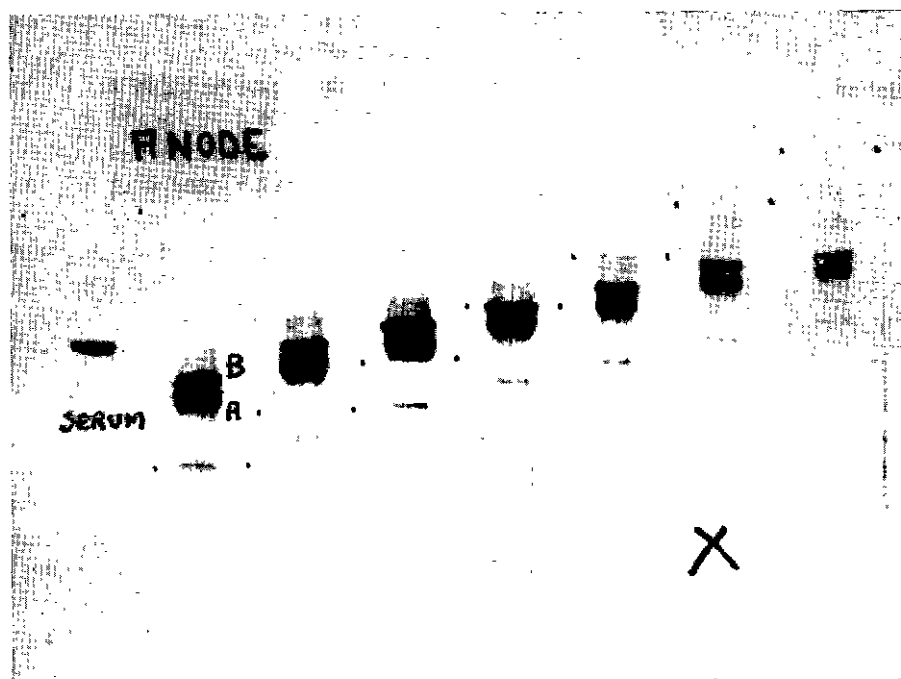


Fig. 2. — Influence de la position du dépôt de l'échantillon provenant de sang total recueilli sur papier filtre. Pratiquement c'est quand le dépôt (indiqué par deux points) est fait au 1/3 vers la cathode que la séparation des hémoglobines A et B est la plus distincte. Dans cette position, on élimine au maximum les interférences dues aux protéines plasmatiques (bande X).

d'acétate de 20 mm. On doit prendre un soin particulier pour effectuer ce dépôt afin de ne pas altérer la surface de l'acétate et d'obtenir un mouvement extrêmement régulier de la main pour que le dépôt soit homogène sur toute sa largeur. Il est nécessaire de souffler dans la pipette pour bien la vider mais il faut éviter la formation de toute bulle d'air à la surface de l'acétate. La solution d'hémoglobine à environ 2 g p. 100 est préparée en éluant 3 cm² de papier filtre imbibé de sang séché dans 0,20 à 0,25 ml de tampon de migration. Le volume varie selon l'appréciation que l'on fait de la quantité de sang déposée sur le papier filtre. Les 3 cm² sont finement découpés avant l'élution qui dure au moins une heure.

3° Données de l'électrophorèse.

Le voltage aux bornes des bandes est de 240 V, soit 16 V/cm. Durée 1 heure. La cuve est placée au réfrigérateur pendant toute la durée de la migration, l'ampérage est de 11 mA pour 8 bandes 20 × 150 mm. Avec ces données, la condensation qui se produit sur le couvercle de la cuve n'est pas suffisante pour que des gouttes tombent sur l'acétate et perturbent les migrations.

d) Interprétations.

1° Coloration.

Les bandes sont placées 10 mn dans une solution colorante en évitant que l'échantillon touche un objet.

Ponceau S colorant	0,2 g
Acide trichloracétique	3,0 g

H ₂ O distillée	100 ml
----------------------------------	--------

Les bandes sont décolorées avec CH₃COOH glacial 5 p. 100 jusqu'à apparition de la surface blanche de l'acétate. Pendant toutes ces opérations les bandes sont dans un bac soumis à une agitation constante par balancement, un cycle dure 30 secondes.

2° Diaphanisation.

On éponge l'excès d'acide acétique puis on plonge les bandes dans une solution d'alcool à 95 p. 100. Agiter pendant 1 mn puis bien essorer.

Placer chaque bande sur une plaque de verre un peu plus large que la bande et mettre la plaque dans la solution de diaphanisation 3 à 4 mn (vérifier que la bande ne s'abîme pas).

p. 100 en volume

Cyclohexanone	33 p. 100
Ethanol à 95 p. 100	67 p. 100

Faire partir l'excès de solution avec un agitateur entouré d'un tuyau en caoutchouc (ce qui empêche la formation des bulles d'air). Laisser sécher la bande à l'air libre ou à l'étuve à 100° pendant 5 à 10 mn.

Ces bandes peuvent ensuite être passées à l'intégrateur.

3° Elution.

Pour une appréciation quantitative, après rinçage avec CH₃COOH, on fait sécher la bande entre 2 feuilles de papier buvard. On coupe chaque fraction colorée à mi-chemin entre les fractionnements. On coupe une surface analogue qui n'est pas colorée pour servir de témoin. On place chacun de ces morceaux dans des tubes différents contenant un volume identique de NaOH 0,1 N ; en général 2 ml suffisent (ne pas dépasser 5 ml).

On agite le tube de façon intermittente jusqu'à extraction totale du colorant.

Ajouter une goutte de CH₃COOH concentré par ml d'éluat de façon à ce que la coloration passe du pourpre au rose.

On passe les éluats dans des semi-microcuvettes et on mesure la densité optique à 540 mμ (pour le rouge ponceau).

III. — RÉSULTATS

Les premiers essais ont été réalisés sur les animaux d'un élevage français de race Montbéliarde particulièrement pure, pour vérifier la valeur de la méthode. Ces hémoglobines ont été déterminées en même temps par électrophorèse en gel de polyacrylamide et les résultats ont toujours été concordants avec ceux obtenus sur acétate de cellulose.

L'ensemble des déterminations figure dans le tableau I ; il représente le typage de l'hémoglobine chez 1.098 bovins.

TABLEAU N°I

Détermination de la nature des hémoglobines chez quelques races bovines
africaines et fréquence correspondante des génotypes

R a c e s	Localisation	N	Nature des hémoglobines déterminées			Fréquence des génotypes d'hémoglobine correspondants		
			A	A et B	B	AA	AB	BB
Montbéliarde	France	107	104	3	0	97,2 p.100	2,8 p.100	0 p.100
N'dama	Bouaké Côte d'Ivoire	20	18	1	1	90 "	5 "	5 "
	Gabon	51	51	0	0	100 "	0 "	0 "
Rénitelo	Kianjasoa Madagascar	299	168	110	21	56,19 "	36,79 "	7,02 "
Zébu Gobra	Dara Sénégal	35	14	21	0	40 "	60 "	0 "
Zébu Brahman	Kianjasoa Madagascar	42	8	21	13	19 "	50 "	31 "
Zébu malgache	Madagascar	226	36	99	91	15,93 "	43,80 "	40,27 "
Zébu soudan	Bambari R.C.A.	67	27	32	8	40,30 "	47,76 "	11,94 "
Zébu bororo	Bambari R.C.A.	242	97	105	40	40,08 "	43,39 "	16,53 "

IV. — DISCUSSION

La valeur technique de ces résultats est indiquée par les figures 3 et 4 qui montrent en particulier la régularité de la migration des hémoglobines A et B d'une part et leur parfaite identité d'une race à l'autre et de taurin à zébu, ceci que l'hémoglobine soit pure ou mélangée au plasma.

Sur la figure 4 on peut voir la migration d'un mélange de méthémoglobine d'un taurin N'Dama AB et d'un zébu Gobra AB, migration qui a le même aspect que celle d'échantillons provenant d'un seul animal de génotype AB pour l'hémoglobine.

La valeur de ces résultats, quant à leur interprétation, dépend évidemment de l'importance de l'échantillonnage dans chaque race. Les intervalles de confiance à 5 p. 100, de la fréquence des génotypes d'hémoglobine sont réunis pour chaque race dans le tableau II.

La lecture des deux premiers tableaux indique qu'en première approximation on trouve plus d'hémoglobine B chez les zébus que

chez les taurins dans le cadre strict de cette enquête. D'un point de vue génétique, il est intéressant de calculer les fréquences correspondant aux gènes hémoglobine A et B pour pouvoir les comparer aux chiffres déjà connus et publiés (tableau III).

La rareté de l'hémoglobine B chez les N'Dama et son absence chez les Gobra méritent de retenir l'attention car chez toutes les autres races africaines et malgaches mentionnées ici ce n'est pas le cas. Les quelques rares N'Dama possédant une hémoglobine B pourraient en hériter d'ancêtres possédant du sang d'importation (Jersey).

La pleine validité des intervalles de confiance indiqués repose sur le choix au hasard des animaux dont les échantillons nous parviennent, choix effectué parmi des populations très vastes, l'échantillon restant petit par rapport à ces populations. Cette dernière condition est parfaitement vérifiée, seul le choix n'est pas entièrement au hasard, il est orienté par les possibilités de prélèvements rencontrés sur place. Mais ces contingences, si elles doivent être

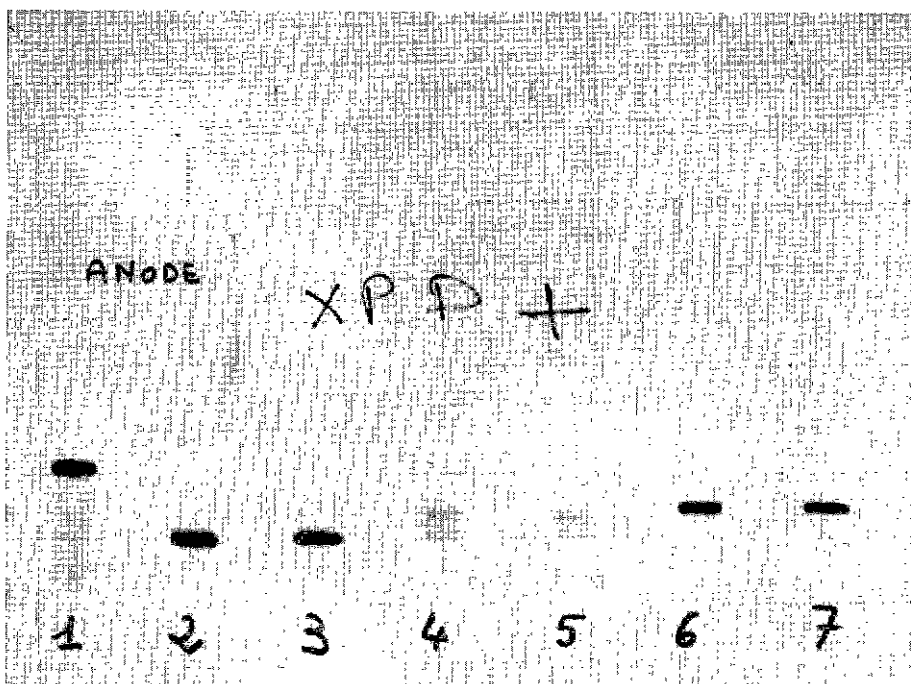


Fig. 3. — Régularité de la migration de diverses hémoglobines A, AB et B. En 1 échantillon de versatol normal qui figure à titre de témoin pour le repérage des mobilités. En 2 et 3 figurent des hémoglobines de type A, en 4 et 5 de type AB et en 6 et 7 de type B, provenant d'animaux très différents.

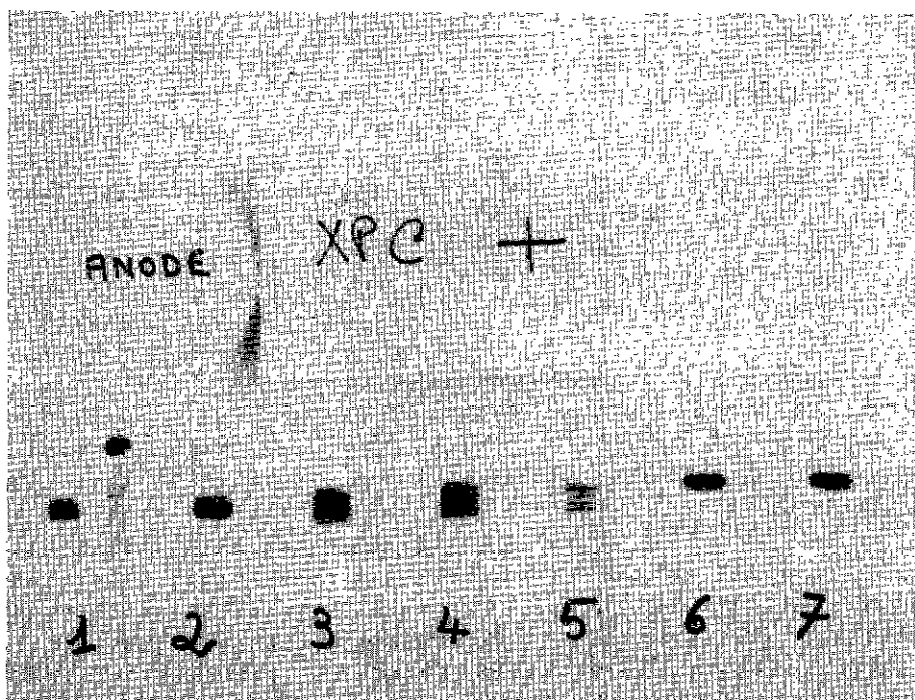


Fig. 4. — Identité des hémoglobines d'origines diverses. En 4 l'échantillon déposé était constitué d'un mélange à parties égales de méthémoglobines pures appartenant à un gobra de génotype AB et à un N'dama de génotype AB également.

En 1 en plus du versatol a été déposé un échantillon d'hémoglobine A de gobra, en 2 hémoglobine A de N' dama, en 3 hémoglobine AB de gobra, en 5 hémoglobine AB de N'dama, en 6 hémoglobine B de gobra et en 7 hémoglobine de N'dama.

TABLEAU N°II

Intervalles de confiance à 5p.100 des pourcentages de chaque génotype d'hémoglobine selon les races étudiées

R a c e s	Intervalle de confiance du pourcentage des génotypes d'hémoglobine			N
	A A	A B	B B	
Montbéliarde	89p.100-98p.100	2p.100-11p.100		107
N'dama	90 " -99 "	0 " -2,7 "	0p.100- 2,7p.100	71
Renitelo	45 " -57 "	32 " -43 "	7 " -14 "	299
Zébu Gobra	24 " -58 "	42 " -76 "		35
Zébu Brahman	9 " -36 "	34 " -66 "	17 " -47 "	42
Zébu malgache	11 " -20 "	35 " -52 "	33 " -47 "	226
Zébu soudan	28 " -52 "	33 " -57 "	5 " -20 "	67
Zébu bororo	34 " -47 "	38 " -51 "	10 " -20 "	242

TABLEAU N°III

Fréquence des gènes correspondant à l'hémoglobine A et B dans les échantillons des races étudiées avec leur intervalle de confiance à 5p.100

R a c e s	Dans les échantillons étudiés	
	Fréquence du gène de l'hémoglobine	
	A	B
Montbéliarde	1 \pm 0,04	0,014 \pm 0,05
N'dama	0,979 \pm 0,04	0,024 \pm 0,05
Renitelo	0,696 \pm 0,06	0,240 \pm 0,05
Zébu Gobra	0,700 \pm 0,160	0,300 \pm 0,160
Zébu Brahman	0,440 \pm 0,120	0,560 \pm 0,150
Zébu malgache	0,378 \pm 0,045	0,622 \pm 0,070
Zébu soudan	0,642 \pm 0,120	0,358 \pm 0,120
Zébu bororo	0,617 \pm 0,07	0,383 \pm 0,07

signalées n'orientent pas systématiquement le choix de tel ou tel animal, comme le ferait le fait de ne retenir que ceux qui se laissent facilement attraper, etc... et donc ne biaisent pas les échantillons. Enfin, les petits pourcentages sont entachés d'une relativement trop grande erreur pour constituer des normes à retenir.

V. — CONCLUSIONS

Ces résultats ne sont qu'une contribution à la détermination biochimique des races. Groupés

avec tous les autres caractères, ils doivent permettre aux zootechniciens d'étudier plus facilement les races pures et leurs croisements et également de rechercher des relations entre races différentes par des caractères biochimiques communs.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à associer dans nos remerciements toutes les équipes qui ont participé à la récolte des échantillons :

Mrs CLAIR et CROUAIL à Bambari, CHAMBELLANT en R. C. A., COULOMB à Bouake, DENIS au Sénégal, MONGODIN qui a assuré la liaison avec Mr GILIBERT du centre de Kianjasoa à Madagascar, CHOQUEL au Congo et CHABEUF qui a assuré la liaison avec la plupart d'entre eux. De même nos

remerciements vont à tous ceux qui ont permis l'expédition de ces échantillons sur papier filtre et aux Directeurs des laboratoires Outre-Mer de l'I. E. M. V. T., Mrs ORUE et SERRES qui ont facilité cette récolte. Que tous trouvent ici l'expression de notre gratitude.

SUMMARY

Determination of the nature of the haemoglobins in 982 African and Malagasy cattle (taurines and zebus) by electrophoresis on cellulose acetate

Samples of total blood removed easily and with a good conservation state far from the place where they were collected, are used to determine the nature of cattle haemoglobins. After the description of protocol of electro-phoresis on cellulose acetate, the results obtained in 982 cattle are discussed in the light of their statistical interpretation, for the 7 African and Malagasy cattle breeds. The frequency of the gens A and B of haemoglobine has been evaluated for each breed ; a generalization of results has been made possible by the indication of their reliance limits.

RESUMEN

Determinación de la natura de las hemoglobinas en 982 bovinos africanos y malgachos (taurinos y cebues) mediante electroforesis sobre acetato de celulosa

El método descrito permite utilizar muestras de sangre total, fácilmente tomadas e ya conservándose muy lejos del sitio donde se recogen, para determinar la natura de las hemoglobinas bovinas. Después de la descripción del proceso de electroforesis sobre acetato de celulosa, se discuten los resultados obtenidos en 982 bovinos con su interpretación estadística para las 7 razas bovinas y malgachas representadas. Se calcula la frecuencia de los genos A y B de la hemoglobina para cada raza, permitiendo una generalización de los resultados sus límites de aseguramiento.

BIBLIOGRAPHIE

- BALAKRISHNAN (C. R.) et NAIR (P. G.). — **Haemoglobin polymorphism in Indian cattle.** *Indian J. Genet. Pl. Breed*, 1966, 26 A (Spec. Symposium No) : 374-85.
- BRAEND (M.), EFREMOV (G.) et RAASTAD (A.). — **Genetics of bovine hemoglobin D.** *Hereditas*, 1966, 54 : 255-59.
- DEMARET (M.). — **Etude d'une ultramicro-méthode d'électrophorèse sur acétate de cellulose (Microzone électrophorèse).** *Ann. Biol. clin.*, 1966, 24 (3-4) : 369-82.
- DEMARET (M.) et HEUDSEN (A.). — **Dosage de l'hémoglobine A₂ après séparation électrophorétique en gel d'amidon et sur acétate de cellulose en « microzone électrophorèse ».** *Ann. Biol. clin.*, 1966, 24 (3-4) : 383-92.
- MULLER (M.), FONTAINE (G.), MULLER (P.). — **Intérêt médico-légal de l'étude électrophorétique de l'hémoglobine.** *Arch. Inst. Méd. lég. Méd. Soc. Lille*, 1966, 203-229 (59 réf.).
- NAIK (S. N.) et SANGHVI (L. D.). — **Haemoglobin Khillari, a new variant in Indian cattle.** *Indian vet. J.*, 1966, 43 : 789-92.

- PINFIELD (A. S.) et RODGERSON (D. O.). — Quantitation of A₂ hemoglobin by electrophoresis on cellulosa acetate. *Clin. Chem. U. S. A.*, 1966, **12** (12) : 883-6.
- SEN (A.), ROY (D.), BHATTACHARYA (S.) et DEB (N. C.). — Haemoglobins of Indian Zebu cattle and the India buffalo. *J. Anim. Sci.*, 1966, **25** : 445-48.
- AICARDI (G.). — Possibilita di impiego dell' acetato di cellulosa per la determinazione della frazione emoglobinica A₂. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 1965, **41** (19) : 1151-53.
- BRIERE (R. O.), GOLIAS (T.) et BATSAKIS (J. G.). — Rapid qualitative and quantitative haemoglobin fractionation. Cellulose acetate electrophoresis. *Amer. J. clin. Pathol.*, 1965, **44** (6) : 695-701.
- MARENGO-ROWE (A. J.). — Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. *J. clin. Pathol. G. B.*, 1965, **18** (6) : 790-2.
- MIKLE (S.). — (Polymorphisme de l'hémoglobine chez les bovins). *Revue Roum. Biol. Ser. Zool.*, 1965, **10** : 273-79 (En russe).
- NAIK (S. N.) et SANGHVI (L. D.). — A new haemoglobin variant in zebu cattle. In blood groups of animals. *Proc. 9th Eur. Anim. Blood grp. conf. Prague*, 1964 : 295-99 (publié en 1965).
- NAIK (S. N.), SUKUMARAN (P. K.) et SANGHVI (L. D.). — A note on blood groups and haemoglobin variants in zebu cattle. *Anim. proc.*, 1965, **7** : 275-77.
- CARR (W. R.). — The hemoglobins of indigenous breeds of cattle in Central Africa. *Rhod. J. agric. Res.*, 1964, **2** : 93-94.
- BARTLETT (R. C.). — Rapid cellulose acetate electrophoresis II. Quantitative hemoglobin fractionation. *Clin. chem. U. S. A.*, 1963, **9** (3) : 325-29.